

本文引用:李 琰,刘佑晖,蔡虎志,陈新宇. 温阳振衰颗粒对慢性肾衰竭大鼠 TGF- β 1/Smad/MMP-2 信号通路的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2022,42(12):1995-2001.

温阳振衰颗粒对慢性肾衰竭大鼠 TGF- β 1/Smad/MMP-2 信号通路的影响

李 琰,刘佑晖,蔡虎志,陈新宇*
(湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007)

〔摘要〕 **目的** 通过研究温阳振衰颗粒对多柔比星诱导的慢性肾衰竭大鼠转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)/Sma 和 Mad 相关蛋白(Sma- and Mad-related protein, Smad)/基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)信号通路的影响,结合肾脏组织病理学、临床血尿生化指标,探讨温阳振衰颗粒对慢性肾衰竭的作用机制。**方法** 选取 SPF 级雄性大鼠 57 只,随机分为正常对照组(15 只)和实验组(42 只)。第 4、第 18 天,实验组尾静脉注射多柔比星 4 mg/kg 进行造模。实验组造模成功后随机分为模型对照组、缬沙坦组、温阳振衰组,每组 14 只。予相应药物或蒸馏水灌胃,每天 1 次,干预 12 周。干预后,检测 24 h 尿蛋白(24 h urine protein, 24 h Upro)、血肌酐(serum creatinine, Scr)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN),光学显微镜观察肾脏组织形态学改变,采用 Western blot 检测肾脏组织中 TGF- β 1、Smad3、Smad7、MMP-2、组织金属蛋白酶抑制物-2(tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIMP-2)的表达。**结果** 与正常对照组比较,模型对照组 24 h Upro、Scr、BUN、TGF- β 1、Smad3、MMP-2、TIMP-2 均明显升高($P<0.05$),Smad7 明显降低($P<0.05$)。与模型对照组比较,温阳振衰组和缬沙坦组 24 h Upro、Scr、BUN、TGF- β 1、Smad3、TIMP-2 均明显降低($P<0.05$),Smad7、MMP-2 均显著升高($P<0.05$)。**结论** 温阳振衰颗粒能有效降低慢性肾衰竭大鼠 24 h Upro、Scr、BUN,下调 TGF- β 1、Smad3、TIMP-2 的表达,上调 Smad7、MMP-2 的表达,并改善肾脏组织形态学变化,减少炎症细胞的浸润和纤维化的发生,延缓慢性病理进展。

〔关键词〕 慢性肾衰竭;多柔比星;温阳振衰颗粒;转化生长因子- β 1;Smad3;组织金属蛋白酶抑制物-2

〔中图分类号〕 R273

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.12.007

Effects of Wenyang Zhenshuai Granule on the expression of TGF- β 1/Smad/MMP-2 signal pathways in the rats model of chronic renal failure

LI Yan, LIU Youhui, CAI Huzhi, CHEN Xinyu*

(The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

〔Abstract〕 Objective To explore the pharmacological mechanism of Wenyang Zhenshuai Granule on chronic renal failure by studying its influence on the expression of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)/Sma- and Mad-related protein (Smad)/matrix

〔收稿日期〕 2022-09-07

〔基金项目〕 湖南省教育厅科学研究项目(20C1412);湖南省研究生科研创新项目(CX2018B474);全国名老中医药专家陈新宇传承工作室建设项目(国中医药人教函[2022]75号)。

〔第一作者〕 李 琰,女,博士,主治医师,研究方向:中医内科学心肾疾病的中医药防治。

〔通信作者〕 * 陈新宇,男,博士,教授,E-mail:chenxinyuchen@163.com。

metalloproteinase 2 (MMP-2) signal pathways of the renal tissue in chronic renal failure rat models induced by adriamycin. Histopathology, urinary protein and serum biochemical indexes were measured to support the study. **Methods** A total of 57 SPF male rats were randomly selected and divided into normal group ($n=15$) and experimental group ($n=42$). The experimental models were developed by injecting adriamycin 4 mg/kg into tail-vein on the 4th and 18th day. As soon as the experimental models were successfully developed, experimental group was randomly divided into model control group ($n=14$), valsartan group ($n=14$) and Wenyang Zhenshuai group ($n=14$). Each group was given corresponding drugs or distilled water by intragastric administration, once a day, for 12 weeks. After intervention, 24 h urine protein (24 h Upro), serum creatinine (Scr) and blood ureanitrogen (BUN) were detected, and the histomorphologic changes of kidney were observed by optical microscope. The expression levels of TGF- β 1, Smad3, Smad7, MMP-2 and tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-2 (TIMP-2) were detected by Western blot. **Results** Compared with normal control group, 24 h Upro, Scr, BUN, TGF- β 1, Smad3, MMP-2 and TIMP-2 increased significantly in model control group ($P<0.05$), while Smad7 remarkably decreased ($P<0.05$). Compared with model control group, 24 h Upro, Scr, BUN, TGF- β 1, Smad3 and TIMP-2 in Wenyang Zhenshuai Granule group and valsartan group decreased significantly ($P<0.05$), and Smad7 obviously increased ($P<0.05$). **Conclusion** Wenyang Zhenshuai Granule can effectively reduce the 24 h Upro, Scr, BUN in rat model of chronic renal failure, down-regulate the expression levels of TGF- β 1, Smad3, and TIMP-2, and up-regulate the expression levels of Smad7 and MMP-2. It also helps to improve the histopathological changes of kidney tissue and to delay the pathological progression of disease by reducing inflammatory cell infiltration and fibrosis.

[**Keywords**] chronic renal failure; adriamycin; Wenyang Zhenshuai Granule; transforming growth factor- β 1; Smad3; tissue inhibitor of metalloproteinase-2

肾纤维化是各种肾脏病进展到终末期肾衰竭的共同通路^[1],以肾小管间质纤维化、肾小球硬化、肾实质丧失和炎症细胞浸润为特征^[2],是各种慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)的最终病理表现之一。肾脏病是影响全人类健康的重要疾病,据 2020 年 WHO 报告显示,CKD 已经成为排行前 10 导致死亡的病因^[3]。目前,我国肾脏病防控依然面临严峻挑战,肾脏病患率高,CKD 患者约 1.2 亿人,尿毒症患者 100~200 万人,CKD 和终末期肾脏病患者呈逐年增多趋势,给国家医疗卫生资源带来沉重的负担^[3]。

转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)是国际公认的促进肾纤维化的重要细胞因子之一^[4],而 Sma 和 Mad 相关蛋白(Sma- and Mad-related protein, Smad)是目前唯一所知 TGF- β 1 受体的胞内激酶底物,介导 TGF- β 1 从细胞膜至细胞核的胞内信号传导,即通过 TGF- β 1/Smad 信号通路介导免疫炎症反应最终导致肾纤维化^[5]。该信号通路的激活可直接诱导细胞外基质(extra-cellular matrix, ECM)的沉积,也可通过促进肾小管上皮细胞转分化(epithelial mesenchymal transition, EMT)而增加 ECM

的产生。研究表明,Smad3 和 Smad7 是 TGF- β 1 下游的重要调节因子,Smad3 有促进纤维化的作用,而 Smad7 作为该通路负反馈调节因子,可阻断 TGF- β 1 介导的纤维化^[6]。

TGF- β 1/Smad 信号转导通路又通过调节基质金属蛋白酶家族及组织金属蛋白酶抑制物系统的转录来调控 ECM 的降解。在基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)/组织金属蛋白酶抑制物-2(tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIMP-2)降解酶系统中,前者参与降解 ECM 中 IV 型胶原等成分,从而减轻病变肾小球内 ECM 的沉积和肾小球硬化进展过程,而后者则是 MMP-2 特异性抑制因子,其作用与 MMP-2 相反,对病变肾小球 ECM 沉积和肾小球硬化进展起促进作用^[7]。

慢性肾衰竭在中医古籍中并无相对应的病名,属中医学“关格”“水肿”“虚劳”“癃闭”等范畴^[8]。本病以正虚为主,邪实为标,病位主要在脾肾,脾阳虚损,肾阳衰微,脾肾气化功能衰竭,升清降浊功能失司,湿浊壅盛,弥漫三焦。由此可见,阳虚证贯穿于慢性肾衰竭发展过程的始终^[9]。

温阳振衰颗粒是陈新宇教授从多年临床实践中总结的治疗慢性肾衰竭的有效方剂,具有益气温阳、利水消肿之功效。在临床运用中也明确证实了该药有降低血肌酐、尿素氮,提高肾小球有效滤过率,改善水肿、乏力、畏寒、精神萎靡等肾阳虚症状的作用^[10]。本实验在此基础上,进一步观察其对慢性肾衰竭大鼠TGF- β 1/Smads/MMP-2信号通路的影响,探讨温阳振衰颗粒防治肾纤维化的分子生物学机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康 SPF 级雄性大鼠 57 只,体重(200 $\pm$ 20) g,由湖南斯莱克景达实验动物技术有限公司提供,动物许可证号:SYXK(湘)2020-0010。所有动物实验均符合湖南中医药大学动物伦理委员会要求(伦理审批号:ZYFY20200115)。

1.1.2 药物 温阳振衰颗粒由制附子、干姜、红参、茯苓、麦冬等药物组成,由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供(批号:20190531),使用无菌蒸馏水煮沸。缬沙坦胶囊(北京诺华制药有限公司,批号:X2068)。注射用盐酸多柔比星(深圳万乐药业有限公司,批号:H44024359)。

1.1.3 主要试剂 BCA 蛋白定量试剂盒(批号:AWB0104)、HE 染色液(批号:AWI0020a)均购自长沙艾碧维生物科技有限公司;TGF- β 1 抗体(英国 Abcam 公司,批号:ab92486);Smad3 抗体(批号:25494-1-AP)、Smad7 抗体(批号:25840-1-AP)、MMP-2 抗体(批号:10373-2-AP)、TIMP-2 抗体(批号:17353-1-AP)均购自美国 Proteintech 公司。

1.1.4 主要仪器 摇床(型号:TS-92)、旋涡混合器(型号:QL-901)均购自江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司;台式冷冻离心机(深圳珠海黑马医学仪器有限公司,型号:TGL-18R);电泳仪(美国 Bio-rad 公司,型号:164-5050);电泳槽(型号:DYCZ-24EN)、转膜仪(型号:DYCZ-40A)、恒温箱(型号:DYY-6C)均购自北京六一生物科技有限公司;磁力搅拌器(常州荣华仪器制造有限公司,型号:a85-1);普通冰箱(合肥荣事达三洋电器股份有限公司,型号:BCD-

245F);电磁炉(美的集团股份有限公司,型号:MC-EP186);精密 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司,型号:E-201-C);电动玻璃匀浆器(宁波新芝生物科技股份有限公司,型号:DY89-1);切片刀(德国莱卡公司,型号:M199);切片机(浙江金华益迪医疗设备有限公司,型号:YD-315);包埋机(常州中威电子仪器有限公司,型号:BMJ-A);显微镜(厦门麦克奥迪电气股份有限公司,型号:BA410E)。

1.2 实验方法

1.2.1 模型建立与分组 将 57 只大鼠随机分为正常对照组(15 只)和实验组(42 只)。实验组分别于第 4、第 18 天从大鼠尾静脉注射多柔比星 4 mg/kg^[11],第 12 周后用代谢笼收集存活大鼠 24 h 尿液,并以 ELISA 法检测尿蛋白,尿蛋白定量>100 mg/24 h 提示模型制作成功^[12]。实验组造模成功后随机分为模型对照组、缬沙坦组、温阳振衰组,每组 14 只。

1.2.2 药物干预 造模成功后开始对各组大鼠予以灌胃治疗,按照大鼠与 60 kg 成人的体表面积换算公式^[13]算出不同组大鼠灌胃的药量。大鼠一次灌胃容量一般为 0.1~0.2 mL/kg,最大可达 5 mL/只。温阳振衰组每天给予温阳振衰颗粒药液 1.62 g/kg 灌胃;缬沙坦组每天给予缬沙坦 8.12 mg/kg 灌胃;模型对照组、正常对照组以 0.2 mL/kg 蒸馏水灌胃。各组均干预 8 周。

1.2.3 标本收集及指标检测 经 12 周造模及 8 周灌胃治疗后,余下正常对照组 15 只,模型对照组 11 只,缬沙坦组 12 只,温阳振衰组 13 只。首先用代谢笼收集大鼠 24 h 尿液,4 $^{\circ}$ C、3000 r/min、半径 15 cm 离心 5 min,送至实验室检测。随后用 10%水合氯醛以 0.035 mL/kg 体质量对大鼠进行腹腔注射麻醉,并予以心脏采血,4 $^{\circ}$ C、3000 r/min、半径 15 cm 离心 10 min;最后行手术腹腔探查,剥离大鼠肾脏,一侧肾脏用 4%多聚甲醛固定,脱水包埋;另一侧肾脏放入液氮,Western blot 和 RT-PCR 分别进行相关指标测定。

1.2.4 肾脏组织病理检测 各组大鼠肾脏组织用 4%多聚甲醛固定后,经脱水、包埋、切片、脱水、脱蜡等步骤,制成 4 μ m 的病理切片。采用 HE 染色,于光学显微镜下观察各样本肾脏组织病理学变化情

况,在 100、400 倍光学显微镜下拍片保存。

1.2.5 Western blot 测定 TGF- β 1、Smad2、Smad3、Smad7、MMP-2、TIMP2 蛋白表达

液氮中剪取 25 mg 肾组织,用冰预冷 PBS 洗组织,加入 200 μ L 裂解液于匀浆器中反复研磨,将蛋白充分裂解;4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min、半径 8 cm 离心 15 min。置于碎冰上,超声匀浆破碎,并离心取上清液,BCA 法测定蛋白浓度,进一步确定上样体积。95 $^{\circ}$ C 变性 10 min,10%的胶电泳,转移至 PVDF 膜,封闭 1 h,然后分别加入小鼠抗 TGF- β 1 抗体(1:300),4 $^{\circ}$ C (1:5000),室温于摇床孵育 1 h,再洗膜 3 次,显影曝光。Image J 测定目的条带与内参 GAPDH 的灰度值之比来反应蛋白表达水平。

1.3 统计学方法

数据统计采用 SPSS 23.0 软件。计量资料用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,首先进行方差齐性检验,当方差齐时,使用独立样本 t 检验比较两组之间的平均值,当方差不齐时,采用秩和检验;多组均数比较,采用 Q 检验进行方差分析,并使用 One-Way ANOVA 方法比较平均值。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况观察

正常对照组大鼠精神状态良好,反应灵敏,行动自如,进食、进水量随体质量逐渐增加,尿量正常,体型圆润,皮毛光滑润泽。模型对照组大鼠精神萎靡,活动少,反应迟钝,肢体蜷缩弓背,喜静,进食量较正常对照组明显减少,进水量、尿量增加,可见便软或不成形,体型消瘦,皮毛粗糙无光泽。缬沙坦组及温阳振衰组大鼠精神状态、皮毛光泽度较模型组稍好转。较正常对照组活动较少,反应欠灵敏,进食量减少,进水量及尿量增加,偶可见稀便,体型偏瘦,体质量增长不明显。实验中模型对照组、缬沙坦组、温阳振衰组大鼠因打斗,各死亡 3、2、1 只。

2.2 各组 SCr、BUN、24 h Upro 的比较

与正常对照组相比,模型对照组 SCr、BUN、24 h Upro 均明显升高($P < 0.05$)。温阳振衰组、缬沙坦组较模型对照组 SCr、BUN、24 h Upro 均明显降低($P < 0.05$)。

温阳振衰组与缬沙坦组上述指标相比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 1。

表 1 各组 SCr、BUN、24 h Upro 的水平($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	SCr/(μ mol·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)	24 h Upro/(mg·d ⁻¹)
正常对照组	15	60.61 $\pm$ 10.26	6.46 $\pm$ 2.30	9.61 $\pm$ 1.81
模型对照组	11	244.53 $\pm$ 40.18*	46.67 $\pm$ 16.57*	451.20 $\pm$ 47.49*
缬沙坦组	12	95.58 $\pm$ 27.29 [#]	34.31 $\pm$ 8.73 [#]	273.55 $\pm$ 32.47 [#]
温阳振衰组	13	107.97 $\pm$ 30.94 [#]	30.96 $\pm$ 6.90 [#]	277.74 $\pm$ 38.78 [#]

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型对照组比较,[#] $P < 0.05$ 。

2.3 各组 TGF- β 1、Smad3、Smad7 蛋白表达水平比较

与正常对照组相比,模型对照组 TGF- β 1、Smad3 均明显升高,Smad7 明显降低($P < 0.05$)。温阳振衰组、缬沙坦组较模型对照组 TGF- β 1、Smad3 明显降低,Smad7 明显上升($P < 0.05$)。温阳振衰组与缬沙坦组上述指标相比,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。详见图 1、表 2。

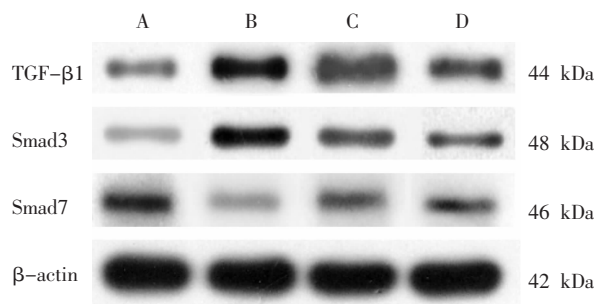


图 1 各组肾组织 TGF- β 1、Smad3、Smad7 蛋白表达电泳结果

注:A.正常对照组;B.模型对照组;C.缬沙坦组;D.温阳振衰组。

表 2 各组 TGF- β 1、Smad3、Smad7 的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TGF- β 1	Smad3	Smad7
正常对照组	15	0.19 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.05	1.58 $\pm$ 0.17
模型对照组	11	0.53 $\pm$ 0.08*	1.15 $\pm$ 0.16*	0.25 $\pm$ 0.08*
缬沙坦组	12	0.30 $\pm$ 0.02 [#]	0.72 $\pm$ 0.03 [#]	0.71 $\pm$ 0.11 [#]
温阳振衰组	13	0.33 $\pm$ 0.04 [#]	0.67 $\pm$ 0.08 [#]	0.74 $\pm$ 0.12 [#]

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型对照组比较,[#] $P < 0.05$ 。

2.4 各组 MMP-2、TIMP2 蛋白表达水平比较

与正常对照组相比,模型对照组 MMP-2、TIMP-2 均明显升高($P < 0.05$)。温阳振衰组、缬沙坦组较模型对照组 MMP-2 明显升高,TIMP-2 明显降低($P < 0.05$)。温阳振衰组与缬沙坦组 MMP-2、TIMP-2 比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。详见图 2、表 3。

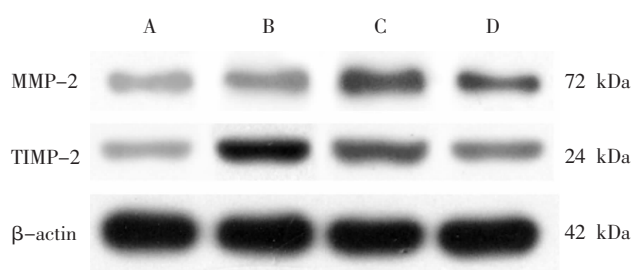


图 2 各组肾组织 MMP-2、TIMP-2 蛋白表达电泳结果

注: A. 正常对照组; B. 模型对照组; C. 缬沙坦组; D. 温阳振衰组。

表 3 各组 MMP-2、TIMP-2 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MMP-2	TIMP-2
正常对照组	15	0.11±0.03	0.07±0.02
模型对照组	11	0.24±0.05*	0.68±0.12*
缬沙坦组	12	0.49±0.07 [#]	0.37±0.05 [#]
温阳振衰组	13	0.52±0.04 [#]	0.33±0.06 [#]

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型对照组比较, [#] $P < 0.05$ 。

2.5 各组肾脏组织形态学的比较

正常对照组肾脏组织无病理改变, 肾小球形态规则, 肾小管结构整齐排列, 肾间质无炎性细胞浸润及纤维增生。模型对照组肾脏组织可见肾小球数量减少, 部分萎缩、硬化坏死、代偿性扩张, 球囊壁粘连, 肾小管萎缩、坏死与明显扩张, 上皮细胞坏死、凋亡; 肾间质与小管分界模糊不清, 间质内有大量炎症细胞浸润及纤维增生。缬沙坦组肾脏组织可见部分肾小球中度扩张、粘连, 肾小管中度扩张, 系膜细胞、纤维组织中度增生, 炎性细胞浸润。温阳振衰组肾脏组织内可见少量炎性细胞浸润, 肾小管管腔轻度扩张, 部分萎缩、坏死, 肾间质可见轻度纤维化, 肾小球轻度扩张, 部分粘连。详见图 3。

3 讨论

肾纤维化主要表现为肌成纤维细胞的大量增生

和 ECM 的过度沉积^[14], EMT 一直被认为是纤维化形成的主要潜在机制, 在此过程中肾小管上皮细胞转化为肌成纤维细胞^[15], 肾小管失去上皮细胞标记物, 如 E-钙黏蛋白、紧密连接蛋白和角蛋白, 同时表达间充质细胞的标记物, 如 α -平滑肌肌动蛋白、波形蛋白和成纤维细胞特异蛋白 1, 细胞迁移力、侵袭力增强, 造成 ECM 过度沉积而逐渐产生肾纤维化^[16]。正常肾单位的丢失使过滤范围缩小, 毛细血管受到挤压而出现狭窄闭塞^[17], 逐渐形成肾小球硬化、肾小管间质纤维化, 肾小球滤过率随之下降, 最终导致肾衰竭^[18]。TGF- β 1 是目前发现最强的促肾纤维化的细胞因子, 在组织纤维化中参与炎症浸润、细胞生长、细胞凋亡和分化等过程^[19]。TGF- β 1/Smad 信号通路在肾纤维化过程中起着至关重要的作用, 有超过 1/3 的肾间质成纤维细胞是由该通路介导的 EMT 转化而来^[2]。Smad 蛋白家族是 TGF- β 1 的下游底物分子, 按其结构和功能可分为 3 种类型^[20]: (1) 受体激活型 (Smad1、Smad2、Smad3、Smad5、Smad8、Smad9); (2) 通用型 (Smad4); (3) 抑制型 (Smad6、Smad7)。TGF- β 1 可诱导 Smad3 磷酸化, 与胶原蛋白的启动子区域相结合来促进肾纤维化, 并可通过诱导 TIMP-1 的产生以及抑制 MMP-1 的活性而使 ECM 降解减少^[21]。相反, Smad7 可通过抑制 Smad2 和 Smad3 磷酸化阻断 TGF- β 1 信号以及促进 TGF- β 1 受体 I 的降解, 从而延缓肾纤维化^[6]。因此, 有效阻断 TGF- β 1 的信号转导, 是终止和减轻肾纤维化程度的关键环节, 也是本研究的关键所在。

本实验成功制备了多柔比星诱导的慢性肾衰竭大鼠模型, 通过运用生化检验、Western blot、HE 染色等技术, 从血尿生化、蛋白表达、肾脏病理等不同

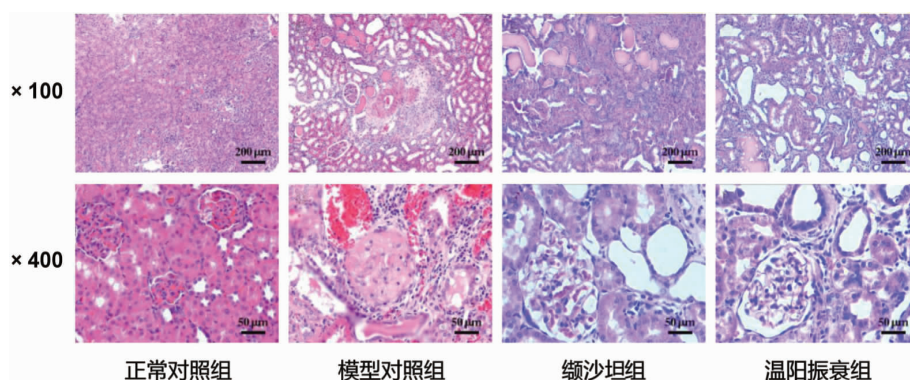


图 3 各组大鼠肾组织 HE 染色结果 (HE)

层次系统地探讨温阳振衰颗粒对慢性肾衰竭大鼠 TGF- β 1/Smads/MMP-2 信号通路的影响, 阐明了药物的作用靶点及作用机制。研究表明, 模型组大鼠肾脏组织可见大量肾小管萎缩、坏死、扩张, 肾小球萎缩、硬化、减少, 间质内纤维增生及炎症细胞浸润现象明显, 肾组织中 TGF- β 1、Smad3、MMP-2 及 TIMP-2 蛋白表达水平均明显升高, Smad7 蛋白水平明显下降。温阳振衰组及缬沙坦组的大鼠肾脏组织病变程度减轻, 肾小管轻中度扩张, 间质内纤维轻度增生及少量炎性细胞浸润, 肾组织中 TGF- β 1、Smad3、TIMP-2 蛋白表达水平较模型组均显著下降, Smad7、MMP-2 蛋白水平明显升高。上述结果揭示温阳振衰颗粒具有显著抑制肾纤维化的作用, 其作用机制可能是通过下调 TGF- β 1、Smad3、TIMP-2 蛋白的表达, 上调 Smad7、MMP-2 蛋白的表达, 从而抑制 TGF- β 1 信号通路活化介导的 EMT 的过程, 促进 ECM 的降解, 最终改善肾纤维化以延缓慢性肾衰竭的进展。

中医经典理论与现代研究相结合, “阳化气, 阴成形”源自《素问·阴阳应象大论》, 是中医学中重要的理论, 阳主动而散, 故能将精血津液转化为气; 阴主静而凝, 能将气转化为精血津液。阳气亏虚, 则水液不运, 饮溢于肌表, 发为“水肿”, 湿邪浊毒壅滞下焦, 发为“癃闭”, 甚至水谷不下, 发为“关格”, 诸如此类, 皆由阳气亏虚所致。肾阳为一身阳气之根本, 《景岳全书·命门余义》载“五脏之阳气, 非此不能发”, 故只有肾阳充沛, 方可温煦五脏六腑, 进而促进精血津液的化生和运行输布^[10]。陈教授临证处方时, 立足该理论, 重在温化阳气、通散阴结, 加减化裁辅以化痰、活血、利水, 往往效如桴鼓、屡起沉疴^[2]。

中医经典思想与现代临床结合, “阳主阴从, 治病贵通”是陈教授从医多年来秉持的中医临床思想, 尤其重视“温法”的应用, 温法为中医治则“八法”之一, 其核心强调顾护人体阳气的重要作用, 论治首重心肾之阳。心为君火, 肾为相火。君火在上, 如日照当空, 为一身之主宰, 相火在下, 系阳气之根, 为神明之基础。《素问·天元纪大论》云: “君火以明, 相火以位。”命火秘藏, 则心阳充足; 心阳充盛, 则相火亦旺。故从心肾阳虚角度治疗慢性肾衰竭, 往往取效^[23]。因此, 温阳与通阳在慢性肾衰竭的治疗中有着不可忽

视的地位和作用。《素问·生气通天论》云: “阳气者, 若天与日, 失其所, 则折寿不彰。”肾阳虚衰则气化无力, 不能蒸化津液以滋养全身, 可见水肿、小便不利、湿浊停留、畏寒肢冷、舌质淡嫩、脉沉细等表现^[24], 温补阳气可使阳气充盛而行使温煦、卫外、通达的作用。通阳的目的, 不仅在于温, 还在于化气利湿、通利小便, 因气机宣通、水道通调则湿邪可从小便而去^[25]。

中医经典方剂与异病同治相结合, 温阳振衰颗粒是陈教授在多年临床工作中总结出的经验方, 由制附子、干姜、红参、茯苓、麦冬等药物组成。其中附子味辛, 性大热, 破阴散寒, 益气温阳, 走而不守为君; 干姜辛热, 守而不走, 助附子破阴回阳, 使温阳之力更大, 固有“附子无干姜不热”之说, 且附子温先天, 干姜温后天, 先天之阳壮, 则后天之火足, 后天之火足, 更助先天之阳。佐以茯苓益气健脾、利水渗湿; 红参温补阳气, 温化水饮, 阳气充沛, 则水无所聚, 湿无由生。使以麦冬滋阴生津, 顾护阴液, 防温燥伤阴。诸药合用, 全方共奏益气温阳、利水消肿之效^[8]。通过前期研究成果^[26-27], 从温阳振衰颗粒可改善慢性心力衰竭的角度出发, 通过分析心肾内在的病理生理联系, 以肾纤维化重要转导通路 TGF- β 1/Smad 为靶点, 提出“温阳振衰颗粒可通过调控 TGF- β 1/Smad 通路干预肾脏纤维化来改善肾功能, 延缓肾衰竭”的假说。运用现代医学指标来阐明温阳振衰颗粒不仅对心功能有明确的改善作用, 也可作用于导致肾纤维化的关键作用靶点, 从而印证了心肾相关、异病同治的中西医内涵。

中医药治疗慢性肾衰竭具有多环节、多靶点、多方位的优势, 疗效肯定, 不良反应少, 协同作用好的优势^[28]。根据目前大量研究成果, 立足中西医理论基础, 今后可利用基因测序筛选, 采用动物基因敲除或细胞转染等实验方法, 更深层次地研究温阳振衰颗粒的作用机制, 提高临床疗效。

参考文献

- [1] 孙倩, 李姗姗, 杨少宁, 等. 中医药调控 Notch 信号通路防治肾脏疾病研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(24): 227-234.
- [2] 陈希琦, 张晓双, 周永坤, 等. TGF- β 1/Smads 信号通路在纤维化疾病中的研究进展[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2021, 27(2): 351-354.
- [3] 陈香美. 中国肾脏病学发展的现状与未来[J]. 中华医学信息导报,

- 2021,36(5):19.
- [4] 郭帅,方敬,陈志强.TGF- β 1介导的Smad和ERK信号通路在肾纤维化中的研究进展[J].中国免疫学杂志,2022,38(6):766-770.
- [5] 李雅纯,刘利飞,陈志强.化痰及通络中药对糖尿病肾病大鼠肾脏氧化应激和TGF- β 1/p38MAPK信号转导通路的影响[J].时珍国医国药,2021,32(6):1286-1289.
- [6] 杨萍芬,牛艳芬.TGF- β 1/Smad信号通路在组织纤维化中的研究进展[J].国际药学研究杂志,2019,46(10):738-744.
- [7] 张明昊,高一盈,赵盈盈,等.复方丹参片通过调控TGF- β 1/Smad通路及基质金属蛋白酶水平对肾纤维化大鼠的作用机制研究[J].中药新药与临床药理,2022,33(3):300-306.
- [8] 刘承玄,欧阳晓琴,杨敬,等.基于数据挖掘国医大师郑新治疗慢性肾衰竭灌肠方药规律研究[J].中国中西医结合杂志,2022,42(2):236-239.
- [9] 杨梦,胡思远,李琳,等.基于“虚气留滞”理论探讨慢性肾衰竭“微炎症状态”的病机及中药防治进展[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(16):229-236.
- [10] 刘佑晖,李琰,蔡虎志,等.温阳振衰颗粒治疗慢性肾功能衰竭阳虚证的临床研究[J].中国中医急症,2018,27(2):202-204,211.
- [11] 姜洪波,孙利伟,田玉玲,等.阿霉素联合头孢噻啶致大鼠慢性肾衰模型的建立及意义[J].中国实验诊断学,2021,25(8):1227-1230.
- [12] 杨维娜,于琳华,郭尚温,等.改良阿霉素肾病大鼠模型的建立[J].西安交通大学学报(医学版),2009,30(4):445-448,452.
- [13] 陈奇.中药药理研究方法[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006:1261-1263.
- [14] 张圣英,尹长江,刘喜纲,等.中医药治疗糖尿病肾脏纤维化研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(11):275-282.
- [15] 姚涛,胡志希,李琳,等.参麦注射液对高血压心衰大鼠肾纤维化TGF- β 1/Smad信号通路的作用研究[J].时珍国医国药,2021,32(8):1821-1824.
- [16] WANG W, ZHOU P H, HU W, et al. Cryptotanshinone hinders renal fibrosis and epithelial transdifferentiation in obstructive nephropathy by inhibiting TGF- β 1/Smad3/integrin β 1 signal[J]. Oncotarget, 2017, 9(42): 26625-26637.
- [17] 黄东华,何红涛,檀银川.肾络通汤对慢性肾小球肾炎患者TGF- β 1,MMP-9和TIMP-1因子的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(15):196-201.
- [18] 李佳睿,雷根平,董盛,等.慢性肾脏病肾纤维化发病机制的研究进展[J].现代中西医结合杂志,2022,31(8):1148-1153.
- [19] 林湘东,向茗,陈新宇.温阳振衰颗粒对TGF- β 1诱导肾小管上皮细胞转分化状态下ERK/STAT3信号转导通路的影响[J].湖南中医药大学学报,2022,42(9):1419-1425.
- [20] 陈美岑,王振常,吕黄华,等.中药干预TGF- β 1/Smad信号通路抗肝纤维化研究进展[J].辽宁中医杂志,2020,47(5):207-210.
- [21] YU X A, HU Y T, ZHANG Y, et al. Integrating the polydopamine nanosphere/aptamers nanoplatfrom with a DNase-I-assisted recycling amplification strategy for simultaneous detection of MMP-9 and MMP-2 during renal interstitial fibrosis[J]. American Chemical Society Sensors, 2020, 5(4): 1119-1125.
- [22] 舒华,孙安会,王笑莹,等.陈新宇运用“阳化气,阴成形”论治内科杂病经验[J].江西中医药大学学报,2021,33(4):13-16.
- [23] 孟桂秀,白龙跃,陈葆康,等.益肾通阳、活血利水法治疗慢性肾心综合症的临床研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2020,18(21):3669-3671.
- [24] 周国民,李建民.从“温阳法”论治慢性肾功能衰竭高钾血症[J].中华中医药杂志,2020,35(6):2939-2942.
- [25] 陈新宇,陈青扬.《金匱要略》治病贵通学术思想及临床意义[J].中华中医药学刊,2009,27(4):704-709.
- [26] 林泉成,陈新宇,戴飞跃,等.温阳振衰颗粒治疗慢性心力衰竭阳虚水泛证的临床研究[J].中医药导报,2019,25(6):82-85,94.
- [27] 欧阳过,蔡虎志,王雅乐,等.温阳振衰颗粒对心肾综合征模型大鼠血浆外泌体及心、肾组织p38MAPK表达的影响[J].中医杂志,2020,61(15):1344-1349.
- [28] 张迪飞,李荣蓉,刘炳然,等.刘旭生教授“补脾益肾”法治疗慢性肾脏病4-5期学术思想[J].中国中西医结合肾病杂志,2021,22(11):945-949.

(本文编辑 黎志清)